



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 124 728** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **G 01 N 33/53, 33/48**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97107559/14, 07.05.1997

(46) Дата публикации: 10.01.1999

(56) Ссылки: 1. SU 1123645 A, 15.11.84. 2. Пигаревский В.Е. Лизосомально-катионный тест. В кн. "Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов". - Л.: 1988, с.87 - 101. 3. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П., Филатова Р.С., Шляховенко В.А. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. - Киев, Наукова думка, 1974, с. 247.

(98) Адрес для переписки:
197376 Санкт-Петербург, ул.Ак.Павлова 12,
НИИЭМ РАМН НОО-отдел

(71) Заявитель:
Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины РАМН

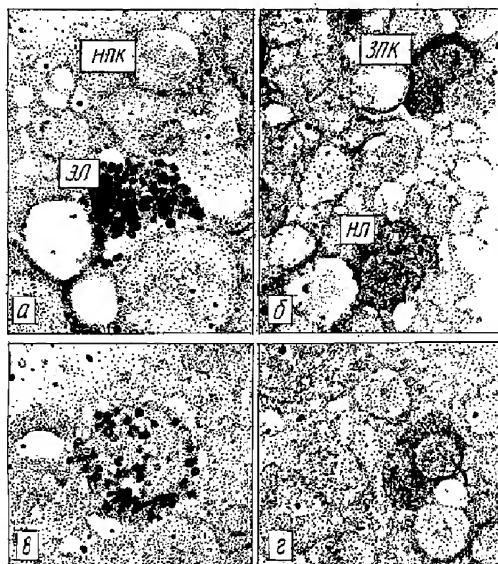
(72) Изобретатель: Пигаревский П.В.,
Загольская В.Н.

(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины РАМН

(54) СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ГРАНУЛОЦИТАРНОГО И ЛИМФОИДНОГО РЯДА

(57) Реферат:

Способ может быть использован в медицине, а именно для цитохимических исследований, и предназначен для лабораторной диагностики специфической и неспецифической резистентности организма при оценке течения ряда патологических состояний: болезней крови и органов кроветворения, воспалительных и иммунопатологических процессов, заболеваний инфекционной природы. Определение клеток производят одновременно на одном препарате после дополнительной окраски его раствором метилового зеленого пиронина с весовым соотношением в нем сухих красителей метиловый зеленый: пиронин, равным 1:1,7. Предлагаемый способ позволяет объективно оценивать степень резистентности организма и судить о ее динамике в процессе лечения. 1 ил.



RU 2 124 728 C1

RU 2 124 728 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 124 728** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **G 01 N 33/53, 33/48**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97107559/14, 07.05.1997

(46) Date of publication: 10.01.1999

(98) Mail address:
197376 Sankt-Peterburg, ul.Ak.Pavlova 12,
NIIeHM RAMN NOO-otdel

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
ehksperimental'noj meditsiny RAMN

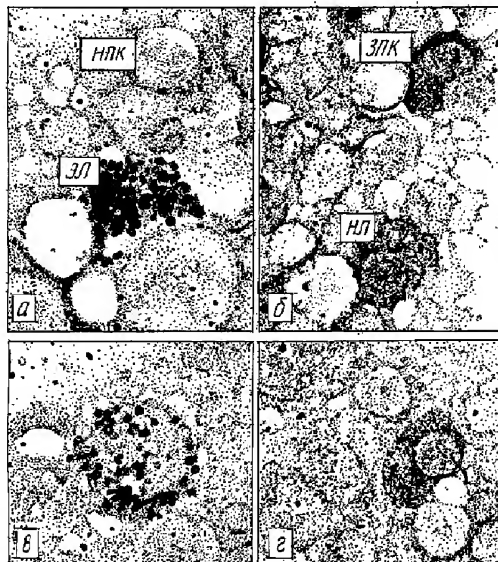
(72) Inventor: Pigarevskij P.V.,
Zagol'skaja V.N.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
ehksperimental'noj meditsiny RAMN

(54) **METHOD OF SIMULTANEOUS ASSAY OF GRANULOCYTE AND LYMPHOID CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, cytology. SUBSTANCE: method involves cell assay after additional staining in a single preparation with a solution of methyl-green dye and pyronin at the following weight ratio of dry dyes: methyl-green/pyronin = 1:1.7. Method can be used for laboratory diagnosis of specific and nonspecific resistance of organism in estimation of pathological states of organism, in part, blood and hemopoietic organ diseases, inflammatory and immunopathological processes and infectious-base diseases. Proposed method ensures to estimate a degree of an organism resistance and its dynamics in the process of treatment. EFFECT: improved method of assay. 3 ex, 1 dwg



RU 2 124 728 C1

RU 2 124 728 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к цитохимическим исследованиям и предназначено для лабораторной диагностики специфической и неспецифической резистентности организма при оценке течения ряда патологических состояний: болезней крови и органов кроветворения, воспалительных и иммунопатологических процессов, заболеваний инфекционной природы.

Для оценки неспецифической резистентности организма при заболеваниях, исследуют клетки гранулоцитарного ряда: нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты. Для оценки специфической резистентности организма при этих же заболеваниях необходимо определить состав и функциональную активность клеток лимфоидного ряда: лимфобластов, плазмобластов, незрелых и зрелых плазматических клеток.

Известен способ определения специфической резистентности организма. Для ее оценки при заболеваниях инфекционной природы, болезнях крови и органов кроветворения, воспалительных и иммунопатологических процессах исследуют состав и функциональную активность клеток лимфоидного ряда с помощью окраски мазков крови и препаратов-отпечатков метиловым зеленым - пиронином /1/.

При этой окраске цитоплазма лимфоидных клеток окрашивается в красный цвет разной степени насыщенности, отражающей активность процесса синтеза антител. Основными компонентами данного красителя являются порошки метилового зеленого пиронина G, ацетатный буфер pH 4,8.

Недостатком данного способа является невозможность судить о клетках гранулоцитарного ряда и следовательно, о состоянии неспецифической резистентности по препарату, так как нет полной картины процесса.

Известен способ Пигаревского В.Е. выявления клеток гранулоцитарного ряда с помощью окраски на катионные белки прочным зеленым /2/, который служит прототипом изобретения. В цитоплазме гранулоцитов при этой окраски определяются лизосомные гранулы зеленого цвета разной степени интенсивности. Основными компонентами этого красителя являются любые марки прочного зеленого, спиртовой раствор красителя на метаноловом буфере, метиловый спирт, соляная кислота. Недостатком данного способа является невозможность судить о специфической резистентности, так как он отражает только одну сторону процесса.

Для одновременного выявления клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда с целью наиболее полной характеристики неспецифической и специфической резистентности организма необходимо проводить анализ на одном препарате, т.е. на одном стекле осуществлять четкое и достоверное окрашивание клеток обоих рядов.

Простым сложением методик обработки препаратов-отпечатков и мазков крови нельзя добиться различительного прокрашивания клеток, так как при этом теряются специфические маркерные свойства красителей и происходит неспецифическое

окрашивание всех клеток.

Поэтому на практике каждую из этих методик применяют самостоятельно на двух разных стеклах-препаратах, что снижает точность диагностики, так как на эти препараты попадают клетки из разных участков очага патологического процесса (например, отпечатки с раневой поверхности всегда будут отличаться друг от друга, поскольку ее клеточный состав неоднороден). Кроме этого, обработка двух препаратов удлинит время проведения окраски, увеличивает расходы реактивов и вспомогательных материалов.

Задачей, которую решает данное изобретение, является создание экспресс-метода для совместного одновременного выявления на одном препарате клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда.

Предлагаемое изобретение позволяет наиболее полно определить состояние резистентности организма, прогнозировать течение патологического процесса, оценивать эффективность проводимого лечения.

Сущностью данного изобретения является использование красителей прочного зеленого и метилового зеленого - пиронина на одном препарате, в результате чего в поле зрения одновременно присутствуют окрашенные клетки гранулоцитарного и лимфоидного ряда, что дает возможность сопоставительно выявлять и оценивать их в образе. Такой результат обеспечивается применением метилового зеленого - пиронина в новой концентрации, а именно: впервые заданном соотношением сухих порошков красителей - 1 часть метилового зеленого на 1,7 частей пиронина. Сокращение времени обработки образца в 2 раза по сравнению с З.А. Бутенко и соавт. /1/ позволяет добиваться четкой картины исследуемых клеток, делая метод анализа экспресс-методом.

Стремясь обеспечить возможность определения одновременно обоих рядов клеток, авторы первоначально обрабатывали препарат, окрашенный прочным зеленым, раствором метилового зеленого - пиронина в концентрации его по З.А. Бутенко и соавт. /1/. На стекле соотношение в этом случае метилового зеленого - пиронина (в сухом виде) составляет 1:4,5.

Краситель метиловый зеленый - пиронин, приготовленный в соотношении 1: 4,5 сухого вещества в случае одновременной окраски с прочным зеленым не дает положительного результата, потому что при простом сложении двух окрасок раздельного выявления клеток обоих рядов не происходит, так как реактив метиловый зеленый - пиронин поглощается на клетках, окрашенных прочным зеленым, что приводит к диффузному прокрашиванию всех клеточных форм в ярко-красный цвет.

Отрицательный результат (невозможность выявления клеток обоих рядов одновременно на одном препарате) получается и при обратной последовательности окраски: вначале метиловым зеленым - пиронином, затем прочным зеленым.

Только изменение соотношения сухих красителей 1:1,7 (метиловый зеленый - пиронин) и проведение окраски таким красителем, только после предварительной обработки препарата прочным зеленым, приводит к одновременной идентификации

клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда. В процессе фиксации и окраски препаратов метиловым зеленым - пиронином время обработки препарата составляет 1 час против 2 часов стандартной окраски /1/.

В препарате, окрашенном предлагаемым способом, одновременно выявляются клетки гранулоцитарного ряда - по гранулам зеленого цвета разной степени насыщенности, находящимся в цитоплазме и содержащим катионные белки и клетки лимфоидного ряда, которые синтезируют антитела, по красному цвету цитоплазмы разной степени интенсивности. Ядра выявляемых клеток окрашиваются от бледно-до темно-синего цвета. Фон, представленный эритроцитами и другими клеточными элементами, почти не прокрашивается.

Преобладание в одном препарате как клеток гранулоцитарного ряда с гранулами ярко-зеленого цвета, крупными, заполняющими всю цитоплазму, так и клеток лимфоидного ряда с ярко-красной цитоплазмой свидетельствует о высокой степени резистентности организма. Снижение этих показателей может служить прогностическим неблагоприятным признаком, указывающим на низкую сопротивляемость (резистентность) организма больного.

Способ осуществляется следующим образом.

Стандартным способом изготавливают тонкие мазки крови или отпечатки тканей. Мазки и отпечатки высушивают на воздухе при комнатной температуре в течение 2 - 4 часов. Затем фиксируют в абсолютном метаноле 5 мин и высушивают на воздухе 5 мин. Препараты погружают на 20 мин в забуференный спиртовой раствор прочного зеленого с pH 7,8 - 8,3. Спиртовой раствор прочного зеленого готовят по методу В.Е. Пигаревского /2/: используют любые марки прочного зеленого (colour index 42053). Спиртовой раствор красителя готовят на метаноловом буфере трис-соляная кислота с конечной величиной pH 7,8 - 8,3. 0,8 г сухого порошка три (окси-метил)-аминометан/трис/ растворяют в 50 мл метилового спирта и к полученному раствору добавляют 47,3 мл дистиллированной воды и 2,75 мл 1 М соляной кислоты, которую готовят из фиксанала. В приготовленном метаноловом трис-буфере растворяют 0,1 г сухого красителя прочного зеленого. В результате получают 0,1% раствор прочного зеленого в 50% метиловом спирте, забуференном до pH 7,8 - 8,3. Порядок растворения веществ роли не играет.

После окраски в прочном зеленом препараты споласкивают в двух сменах дистиллированной воды и переносят в раствор метилового зеленого - пиронина на 1 час. Раствор метилового зеленого - пиронина готовят следующим образом.

45 мг сухого порошка метилового зеленого, предварительно промытого в хлороформе, и 75 мг сухого порошка пиронина растворяют в 30 мл дистиллированной воды, затем к полученному раствору добавляют 30 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 4,4 - 5,0. После окраски в метиловом зеленом - пиронине препараты споласкивают в двух сменах

дистиллированной воды и высушивают. После высушивания препараты пригодны для многократного микроскопического исследования, так как иммерсионное масло не реагирует с используемыми красителями.

Результаты окраски.

В препарате, окрашенном предлагаемым способом, при высокой степени резистентности организма выявляются многочисленные гранулоциты и лимфоциты. Цитоплазма первых заполнена лизосомными гранулами ярко-зеленого цвета (показатель высокой антимикробной активности клеток), цитоплазма которых окрашена в ярко-красный цвет (показатель интенсивного синтеза антител).

При низкой степени резистентности (сопротивляемости) организма наблюдается снижение количества гранулоцитов и лимфоцитов. В выявляемых гранулоцитах отмечается как снижение интенсивности окраски гранул до бледно-зеленой, так и количества их в цитоплазме. В лимфоцитах наблюдается ослабление окраски до бледно-розовой.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет объективно оценивать степень резистентности организма и судить о ее динамике в процессе лечения.

На чертеже, иллюстрирующем данное изобретение, представлены фотографии препаратов, приготовленных предлагаемым способом.

Световой микроскоп. Увеличение x 1300.

На чертеж:

а. Четко видны эозинофильный лейкоцит (ЭЛ) и незрелая плазматическая клетка (НПК).

б. Четко идентифицируется нейтрофильный лейкоцит (НЛ) и зрелая плазматическая клетка (ЗПК).

в. Четко просматривается эозинофильный лейкоцит.

г. Явно видна плазматическая клетка.

Пример 1.

Кролик, норма. Биопсия селезенки.

Препарат-отпечаток окрашен, 0,1% раствором прочного зеленого, pH 7,8 - 8,3 и раствором метилового зеленого - пиронин. Чертеж, а, увеличение x 1300.

На фоне слабоконтурных клеток, не относящихся к предмету исследования, выявляется эозинофильный лейкоцит (ЭЛ) с катионными белками в виде зеленых гранул в цитоплазме, рядом находится незрелая плазматическая клетка (НПК) с цитоплазмой розового цвета.

Нормальная степень резистентности организма.

Пример 2.

Больной И., 50 лет. Клинический диагноз: острый лимфаденит. Биопсия шейного лимфатического узла. Препарат-отпечаток окрашен 0,1% раствором прочного зеленого pH 7,8 - 8,3 и раствором метилового зеленого - пиронин. Чертеж, б, увеличение x 1300.

Выявлен нейтрофильный лейкоцит (НЛ) с плотно прилежащими друг к другу гранулами зеленого цвета, рядом расположена зрелая плазматическая клетка (ЗПК), цитоплазма которой окрашена в красный цвет.

Высокая степень резистентности организма. Начало заболевания.

Пример 3.

Кролик, экспериментальный атеросклероз воспроизведен по методу Н.Н. Аничкова,

длительность опыта 8 недель. Мазок крови окрашен 0,1% раствором прочного зеленого - пиронин. Чертеж, в, г, увеличение x 1300.

Эозинофильный лейкоцит, чертеж, в, с крупными гранулами ярко-зеленого цвета в цитоплазме, на этом же мазке в другом поле зрения обнаружена плазматическая клетка, чертеж, г, с цитоплазмой ярко-красного цвета.

Высокая степень резистентности организма. Активация иммунокомпетентных органов.

Представленные иллюстрации являются примерами нормальной и повышенной (в ответ на заболевание) резистентности (сопротивляемости) организма на материале, полученном как от экспериментальных животных, так и от человека, как в виде препарата-отпечатка, так и мазка крови.

Применение методики по изобретению дает наиболее полную характеристику резистентности организма за счет одновременного определения на одном препарате состава и функциональной активности как клеток гранулоцитарного, так

и лимфоидного ряда в норме и при некоторых заболеваниях.

Предлагаемый способ дает возможность проводить экспресс-диагностику в условиях клинической лаборатории. Отмечается повышение точности диагностики, уменьшение времени проведения фиксации - в 4 раза (сравнение: 5 мин по изобретению и 20 мин /1/), времени окраски - в 2 раза (сравнение: 1 час по изобретению и 2 часа по /1/), экономия реактивов и материалов - в 8 раз.

Формула изобретения:

Способ определения клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда, включающий окрашивание их прочным зеленым по Пигаревскому В.Е., отличающийся тем, что определение производят одновременно на одном препарате после дополнительной окраски его раствором метилового зеленого - пиронина с весовым соотношением в нем сухих красителей:

метилловый зеленый : пиронин 1 : 1,7.

25

30

35

40

45

50

55

60